

Anticorps monoclonaux anti-Leishmania, hybridomes sécré-
teurs de ces anticorps, antigènes de Leishmania reconnus
par ces anticorps, procédé d'obtention et applications de
ces anticorps monoclonaux et de ces antigènes.

5

L'invention est relative à de nouveaux anticorps monoclonaux anti-Leishmania et à des hybridomes sécréteurs de tels anticorps monoclonaux. Elle concerne plus particulièrement des anticorps monoclonaux susceptibles d'induire
10 une activité protectrice à l'égard d'un hôte sensible à l'infection par les leishmanies et également de reconnaître des polypeptides provenant de ces parasites et qui sont eux-mêmes reconnus par des sérums obtenus à partir d'hôtes infectés par diverses espèces de leishmanies. Elle
15 concerne enfin des antigènes susceptibles d'être reconnus par ces anticorps et l'utilisation de ces antigènes pour la constitution de compositions de vaccins destinées à l'homme ou à l'animal, notamment les chiens.

Les leishmanioses recouvrent un ensemble complexe
20 d'infections qui ont en commun d'être causées par des parasites intracellulaires du genre Leishmania. On peut se reporter au préambule de la demande internationale de brevet PCT/US 82/01678, déposée le 17 novembre 1982 et publiée sous le n° WO83/01785, pour disposer d'une revue
25 générale des différentes formes que peuvent revêtir ces infections et des différentes espèces de Leishmanies qui en sont la cause. Le développement de ces infections tant dans les pays du tiers monde que dans des pays industrialisés est d'autant plus préoccupant que l'on ne dispose à
30 l'heure actuelle que de peu de moyens pour combattre les différentes infections causées par ces parasites et pour enrayer leur extension à de nouveaux territoires. L'arsenal thérapeutique est limité et il n'existe actuellement aucune vaccination pouvant aboutir à une prévention efficace sans complications secondaires.
35

La diversité antigénique des leishmanies a été

mise en évidence notamment par l'utilisation des anticorps monoclonaux. On notera à ce sujet, outre la demande internationale de brevet susmentionnée les travaux réalisés par D. McMAHON PRATT et John R. DAVID, (1981), Nature, Vol. 291, 581-583 ; de E. HANDMAN et R. E. HOCKING (1982), Infections and Immunity, 28-33 ; de E. HANDMAN, H. M. JARVIS et G.F. LITCHELL (1984) Parasite Immunology, 5, 223-233. L'impression d'ensemble qui se dégage de la littérature existante est précisément la grande variété d'anticorps monoclonaux qui ont été fabriqués, ces anticorps monoclonaux devant permettre des identifications désormais précises des différentes espèces et sous-espèces existantes de Leishmanies. Les publications décrivant des effets de protection d'un hôte vivant contre certaines espèces de leishmanies sont beaucoup plus rares. On citera néanmoins les résultats de protection in vivo par des anticorps monoclonaux contre les promastigotes de Leishmania mexicana qui ont été obtenus par ANDERSON et Coll. (1983) The Journal of Immunology, 131, 1616-1618, à l'occasion de la mise en oeuvre d'un test dénommé "Winn assay system". Le principe de ce test est décrit dans un article de H.J. WINN (1960) publié dans le "J. of Immunology", Vol. 84, p. 530.

L'invention procède d'une démarche différente. En effet, elle avait pour but la production d'anticorps monoclonaux (ou de compositions à base de plusieurs types d'anticorps monoclonaux) qui soient capables, d'une part, de reconnaître des déterminants antigéniques communs à des espèces variées de leishmanies, d'autre part, d'entraîner un effet protecteur in vivo contre ces diverses espèces. Un autre objectif était l'isolement d'un ou plusieurs antigènes susceptibles d'induire chez l'hôte auxquels ils peuvent être administrés l'acquisition d'une immunité globale, par conséquent également une protection globale contre les différentes leishmanioses cutanées, cutanéomuqueuses et viscérales de l'Ancien et du Nouveau monde.

Plus particulièrement encore, l'invention a pour but de fournir un procédé permettant de conduire la sélection des hybridomes sécréteurs d'anticorps vers ceux qui seront capables de produire les anticorps monoclonaux
5 répondant aux caractéristiques sus-indiquées.

Les anticorps monoclonaux anti-Leishmania selon l'invention sont caractérisés par leur capacité à inhiber l'infection de cellules sarcomateuses par les formes promastigotes de une ou plusieurs espèces de Leishmania,
10 lorsque ces cellules sarcomateuses sont mises en contact avec lesdites formes promastigotes pré-incubées avec ces anticorps monoclonaux dans des conditions qui, en l'absence desdits anticorps monoclonaux, conduiraient à une parasitémie élevée dans lesdites cellules.

Un procédé d'obtention et d'isolement d'hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux anti-leishmania possédant les propriétés sus-indiquées est caractérisé en ce que l'on met en contact les formes promastigotes infectieuses avec, d'une part, des anticorps monoclonaux reconnaissant des antigènes d'une ou plusieurs espèces de leishmanies et secrétés parmi des hybridomes préalablement formés de façon en soi connue entre des cellules de myélome et des cellules spléniques d'un animal, notamment la souris, préalablement immunisé contre une ou plusieurs
20 souches de leishmanies et, d'autre part, avec des cellules sarcomateuses dans des conditions qui, en l'absence desdits anticorps, conduiraient à une infection parasitaire desdites cellules sarcomateuses, et en ce que l'on sélectionne ceux de ces anticorps monoclonaux qui, dans l'opération précédente, protègent complètement in vivo les cellules sarcomateuses vis-à-vis de l'infection par lesdites leishmanies, après leur injection dans le péritoine d'une souris sensible auxdites cellules sarcomateuses, plus particulièrement d'une souris Balb-C. De préférence -mais non
30 nécessairement- les formes promastigotes mises en oeuvre

sont prétraitées avec les anticorps monoclonaux dans la souris Balb-C. Ce prétraitement consiste de préférence en un contact maintenu à 37°C, pendant 30 minutes. L'infection éventuelle desdites cellules sarcomateuses peut être appréciée par prélèvement de l'ascite, lorsque celle-ci s'est formée dans la cavité péritonéale de la souris, mise en culture des cellules sarcomateuses de l'ascite dans un milieu approprié, par exemple le milieu NNN, et détection éventuelle des promastigotes formés dans le milieu. Il va sans dire que la sélection des hybridomes sécréteurs est en rapport direct avec celle des anticorps monoclonaux protecteurs.

Il résulte de ce qui précède que l'invention met en jeu la capacité des anticorps monoclonaux finalement sélectionnés d'exercer une activité protectrice efficace vis-à-vis des cellules particulièrement sensibles à l'infection parasitaire. Les cellules sarcomateuses connues sous la désignation "TG180" décrites par SARTORELLI A.C. et BOTH B. A. (1961) Federation Proceedings, 20, 156-159, se sont révélées à ce point sensibles que l'on a proposé de les utiliser pour la production rapide et en grande quantité de leishmanies, plus particulièrement sous leur forme amastigote (forme intracellulaire des leishmanies). Les conditions de cette production et de l'isolement des leishmanies décrites ont été décrites par L. MONJOUR et Coll. dans l'article intitulé "Rapid, Large, Scale Production and Isolation for Leishmania Amastigotes", Annals of Tropical Medicine Parasitology (1984), 78, 423-425. Par ailleurs ces cellules TG 180 produisent une ascite lorsqu'elles sont injectées à une souris Balb-C ; par conséquent la moindre cellule sarcomateuse infectée amplifiera chez la souris la réponse à l'infection en multipliant les cellules infectées et en propageant l'infection au moins à toute l'ascite.

L'invention résulte donc d'une orientation de recherche basée sur l'hypothèse initiale qui a été faite (et

qui s'est révélée féconde) qu'il devait être possible de produire et d'isoler des anticorps monoclonaux anti-Leishmania capables de protéger des cellules normalement aussi sensibles à l'infection parasitaire. Cette hypothèse allait donc également fournir l'essence du test particulièrement rigoureux qui constitue le fondement du procédé de production et de sélection des anticorps monoclonaux protecteurs conformes à l'invention.

L'invention concerne donc plus particulièrement les anticorps monoclonaux caractérisés par la capacité qu'ils ont d'inhiber l'infection parasitaire de cellules de la lignée TG180, lorsque 2×10^3 cellules de cette lignée sont injectés dans le péritoine de souris Balb-C, en mélange avec 60 microlitres d'ascite contenant les susdits anticorps monoclonaux et 10^5 promastigotes qui avaient été incubés au préalable en présence desdits anticorps monoclonaux à 37°C et pendant 30 minutes. En l'absence des anticorps monoclonaux protecteurs, un tel traitement conduirait à une parasitémie aiguë des cellules. Ces indications quantitatives déterminent également les conditions préférées du test de sélection qui est mis en oeuvre dans le procédé selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux mis en oeuvre dans les opérations d'infection des cellules sarcomateuses en vue de la sélection des anticorps monoclonaux protecteurs résultent de préférence déjà d'une pré-sélection. Comme on l'a indiqué plus haut, les anticorps monoclonaux mis en oeuvre sont ceux qui reconnaissent des antigènes d'une ou plusieurs espèces de leishmania.

Cette pré-sélection peut être réalisée de toutes façons en soi connues, par exemple dans les conditions qui suivent (et dont d'ailleurs un exemple de mise en oeuvre détaillée sera indiqué plus loin dans l'exemple).

Partant d'une ou de plusieurs espèces choisies de parasites, on immunise un animal, notamment la souris,

avec les parasites sous la forme promastigote et l'on réalise une fusion cellulaire des cellules spléniques de l'animal préalablement sacrifié avec des cellules de myélome appropriées, essentiellement selon la méthode décrite par KOHLER G. et MILSTEIN C. (1975), *Nature*, 256, 495-497. Les cellules hybrides productrices d'anticorps peuvent ensuite être clonées par toute méthode en soi connue, de préférence par la méthode des dilutions limites. Les hybridomes finalement sélectionnés sont ensuite mis en oeuvre dans la production d'ascites, de préférence par la technique décrite par ROSETO A. et Coll. (1983), *Journal of Virology*, 64 : 237-244. La détermination des classes IgG est ensuite réalisée de préférence par la méthode d'immunodiffusion, décrite par ROSETO A. et Coll. (1982), *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 294 : 347-352. De préférence, on recueille les hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux appartenant à la classe des immunoglobulines IgG et l'on trie les surnageants de culture des clones obtenus ou les liquides ascitiques correspondants, selon la méthode décrite par MONJOUR L. et Coll. dans "Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale" (1978), 58 : 293-300, pour ne retenir dans un premier stade (sur la majorité) que les anticorps monoclonaux qui fixent plusieurs leishmanies à la fois, avantageusement sur au moins l'un des parasites appartenant à chacune des espèces L. infantum, L. tropica, L. brasiliensis et L. mexicana (détection de la fixation par immunofluorescence indirecte globale) et, au terme d'un second tri, ceux des anticorps monoclonaux qui se fixent sur les parasites vivants ou tués.

Il va de soi que l'on peut également mettre en oeuvre tout autre protocole de production et de sélection d'anticorps monoclonaux aptes à reconnaître les parasites vivants ou tués. Il convient d'ailleurs de noter que la sélection des anticorps monoclonaux parmi ceux d'entre eux qui présentent les caractéristiques des immunoglobulines IgG n'est obligatoire en aucune façon.

La mise en oeuvre dans le procédé selon l'invention d'un ou de plusieurs anticorps monoclonaux anti-Leishmania ainsi préalablement sélectionnés peut conduire non seulement à des anticorps monoclonaux protecteurs contre celles des espèces de parasites initialement mises en oeuvre (à l'occasion de l'immunisation des animaux, dont les cellules spléniques ont ensuite été mises en oeuvre pour la production de ces anticorps monoclonaux), mais encore contre des espèces de leishmanies différentes. Il est à cet égard remarquable que la mise en oeuvre du procédé selon l'invention à partir de plusieurs espèces de parasites permet d'isoler des anticorps monoclonaux reconnaissant un ou plusieurs antigènes qui se sont avérées être communs à un grand nombre d'espèces de leishmanies.

En particulier, la mise en oeuvre du procédé selon l'invention dans les conditions qui seront décrites plus loin permet d'isoler des anticorps monoclonaux reconnaissant des antigènes ou protéines ayant (pour certains de ces anticorps monoclonaux) des poids moléculaires de l'ordre de 40.000, 70.000 et 113.000 et, pour d'autres anticorps monoclonaux, des antigènes ou protéines ayant des poids moléculaires de l'ordre de 140.000 (précision de l'ordre de 10 %), tous ces antigènes ou protéines pouvant être obtenus à partir de lysats de leishmanies, notamment dans les conditions qui seront rappelées plus loin.

Le procédé selon l'invention peut donc, au niveau de l'infection des cellules sarcomateuses, être mis en oeuvre avec des anticorps monoclonaux dont a été reconnue la capacité, au cours de tris préalables, de reconnaître des antigènes d'espèces différentes. En alternative, on peut également mettre en oeuvre, au niveau de l'infection des mélanges d'anticorps monoclonaux obtenus à partir d'hybridomes pré-sélectionnés et ayant mis en jeu des Leishmanies appartenant à des espèces différentes au niveau de l'immunisation initiale. Par exemple, on met en oeuvre au niveau de l'infection un mélange d'anticorps

monoclonaux obtenus à partir d'hybridomes qui ont eux-mêmes été obtenus par hybridation entre des cellules de myélomes et des cellules spléniques provenant de souris qui avaient été immunisées respectivement par L. mexicana,
5 L. tropica, L. donovani, L. infantum et L. brasiliensis.
Lorsque l'on a déterminé la capacité d'un mélange déterminé d'anticorps monoclonaux de protéger les cellules sarcomateuses contre l'infection in vivo par une pluralité de parasites déterminés, on peut encore répéter l'essai de
10 protection avec chacun des anticorps monoclonaux déterminés contenus dans le mélange, en vue de rechercher celui qui est plus particulièrement capable de protéger les cellules sarcomateuses contre l'ensemble desdits parasites et par conséquent d'isoler l'hybridome correspondant.

15 Les méthodes proposées ci-dessus ne sont qu'indicatives de toutes celles qui peuvent être mises en oeuvre pour mettre en évidence ou isoler des polypeptides portant les sites antigéniques intervenant dans la réaction antigène-anticorps. Les techniques de recombinaison génétique pourront également être mises en oeuvre aux mêmes
20 fins.

Les polypeptides reconnus par des anticorps selon l'invention peuvent, surtout lorsqu'ils sont communs à plusieurs espèces de leishmanies, être utilisés pour la
25 production de compositions pharmaceutiques destinées à la vaccination contre les leishmanioses. Ces polypeptides y sont alors associés avec les véhicules physiologiquement acceptables appropriés aux méthodes de vaccination. Avantageusement ces compositions pharmaceutiques sont constituées de façon appropriée à l'administration par injection.
30

Des caractéristiques supplémentaires préférées de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit de conditions préférées qui ont été mises en oeuvre pour la production, la sélection et l'isolement d'hybridomes conformes à l'invention.
35

1 - PARASITES

On a utilisé les formes promastigotes des espèces suivantes : L. infantum LEM 497, L. tropica LEM 129, L. brasiliensis guyanensis LEM 311 et L. mexicana amazonensis LV 79 pour la caractérisation des antigènes reconnus par les anticorps. En plus de ces souches, les souches suivantes ont été utilisées pour les expériences de protection : L. brasiliensis guyanensis : Cay H 60 et Cay H 53 ; L. donovani : ANTWERPEN, ITMAP 430 (Portugal), ITMAP 263 (Maroc), ITMAP 240-366 (Tunisie), ITMAP 1356 (Italie), LV 9 (Ethiopie), LEM 139 (Inde), L. mexicana mexicana LEM 280, L. tropica LV 39.

2 - PRODUCTION DE FORMES PROMASTIGOTES INFECTIEUSES

2×10^3 cellules sarcomateuses de souris (A. C. SARTORELLI et B.A. BOTH., Ped. Proc., 20, 1961, p. 156-159), dénommées TG 180 (P. COUZINEAU et H. BAUFINE-DUCROC, Ann. Par. Hum. Comp. 44, 1969, 217-224) sont mélangées à 2×10^6 formes promastigotes. Après injection par voie intrapéritonéale à la souris Balb/c, un liquide d'ascite est recueilli 7 à 10 jours plus tard. Une centrifugation de ce liquide donne un culot de cellules sarcomateuses infectées par des formes amastigotes. Après 4 jours de culture en milieu NNN à 22°C, on obtient une prolifération de promastigotes constamment infectieux pour la souris Balb/c (L. MONJOUR, I. VOULDOUKIS, O. BRANDICOURT, D. MAZIER, C. ALFRED, I. PLOTON et M. GENTILINI, Ann. Trop. Med. Par. 1984, 78, 423-425).

3 - PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

a) Immunisation des souris

Des souris Balb/c ont subi 3 injections sous-cutanées, espacées chacune de 15 jours, avec 10^6 promastigotes de L. infantum mélangés à 10 microgrammes d'un immunoadjuvant à base de saponine commercialisé sous la désignation QUIL A. Un mois plus tard, les souris ont subi une dernière injection intrapéritonéale de 2×10^7 promastigotes. 4 jours plus tard, les souris ont été sacrifiées

et leurs cellules spléniques prélevées.

b) Hybridomes

La fusion des susdites cellules spléniques et de
cellules de myélome SP2/O, la culture des hybrides, la
5 détection des anticorps monoclonaux, leur caractérisation
par immunodiffusion radiale et la production d'ascites ont
été effectuées selon des protocoles décrits précédemment
(A. ROSETO, T.F. VAUTHEROT, P. BOBULESCO et M.C.
GUILLEMIN, C.R. Acad. Sciences Paris - 294, 1982, p.
10 347-352).

c) Mise en évidence des anticorps

Les produits de sécrétion des hybridomes ont été
éprouvés sur des promastigotes de l'Ancien et du Nouveau
monde, morts ou vivants, et ce, par immunofluorescence
15 indirecte (L. MONJOUR, C. MILLE, P. DRUILHE et M.
GENTILINI, Ann. Soc. Belge Med. Trop., 58, 1978, p. 293-
300). 10 ascites ont produit une réaction positive contre
au moins certaines des espèces de parasites identifiés
dans le tableau plus loin. 5 ascites se sont révélées
20 produire une réaction positive contre chacune desdites
espèces de parasites.

4 - EPREUVES D'INHIBITION

Ces épreuves ont été menées sur plusieurs espèces
de leishmanies de l'Ancien et du Nouveau monde. 5 anti-
25 corps monoclonaux de l'isotype IgG1, produits en ascite et
réagissant positivement en immunofluorescence sur les pro-
mastigotes, ont été sélectionnés, puis mélangés pour les
essais d'inhibition. 60 microlitres du mélange ont été mis
en contact avec 10^5 promastigotes d'une espèce, à 37°C,
30 pendant 30 minutes. 2×10^3 cellules TG 180 ont alors été
ajoutées ; après un lavage, le mélange a été injecté in-
trapéritonéalement à la souris Balb/c. 10 jours plus tard,
l'ascite formée est prélevée par aspiration à la seringue.
La recherche des amastigotes intra et extracellulaires se
35 fait sur une préparation colorée au May-Grünwald-Giemsa.
La présence de promastigotes est révélée après 20 jours

d'incubation des cellules ascitiques en milieu NNN. Les contrôles expérimentaux sont les suivants : anticorps monoclonaux anti-Plasmodium falciparum et anti-HBs, surnageants d'ascites provoqués par l'injection de pristane et de myélome SP2/0 ; un autre contrôle consiste à mettre en contact l'ascite induite par le sarcome TG 180 avec chaque espèce de la panoplie des leishmanies, à 37°C, pendant 30 minutes. Enfin, le caractère pathogène des espèces est prouvé par l'infection, dans les mêmes conditions, de cellules sarcomateuses avec chaque espèce de Leishmanie.

5 - CARACTERISATION ANTIGENIQUE

Des lysats des différents parasites, réalisés en présence d'inhibiteurs de protéases (PMSF et TLCK à 10^{-3} M) ont été analysés, par immunoempreinte sur feuille de nitrocellulose (H. TOWBIN, T. STAHELIN et I. GORDON, PNAS, USA, 76, 1979, p. 4350-4354) du profil électrophorétique obtenu par la technique de Laemmli (V.K. LAEMMLI, Nature, 227, 1970, p. 680-683) en gel d'acrylamide à 10 %. Les complexes antigènes-anticorps ont été révélés par des anti-anticorps marqués à la peroxydase selon Avrameas (S. AVRAMEAS et B. GUILBERT, Eur. J. Imm., 1, 1971, 394-396).

Les poids moléculaires des antigènes ont été appréciés d'après leurs distances de migration dans le gel, comparées à celles des protéines suivantes de poids moléculaires connus : ferritine (220 kD), ovotransferrine (77 kD), albumine bovine (67 kD), catalase (60 kD), ovalbumine (45 kD), lactate déshydrogénase (36 kD), chymotrypsinogène A (25,7 kD), ferritine (forme monomère) (18,5 kD), myoglobuline (17,2 kD), cytochrome c (12,3 kD).

6 - SERUMS HUMAINS

Les sérums de deux malades atteints de leishmaniose viscérale, confirmée par la présence de parasites à l'examen direct, ont permis de compléter selon le protocole précité, la carte antigénique. Il s'agissait de deux infections, contractées en zone méditerranéenne (Hérault

et Algérie), ayant évolué respectivement pendant 3 et 6 mois.

RESULTATS :

1 - CHOIX DES ANTICORPS MONOCLONAUX

5 Après clonage par dilution limite des hybrides positifs, seuls 5 hybridomes sécrétant des anticorps d'isotype IgG1 ont été retenus. En immunofluorescence, ils marquent la membrane des promastigotes vivants. Ces anticorps ont ensuite été produits dans des ascites de souris.

10 2 - EPREUVES D'INHIBITION

 L'effet inhibiteur des anticorps monoclonaux sur le développement des 4 espèces de Leishmanies a été révélé par l'absence d'amastigotes dans les cellules sarcomateuses injectées par voie intrapéritonéale. Dix jours après
15 l'injection, le transfert des cellules en milieu NNN ne révèle pas la présence de formes promastigotes. En revanche, les couplages réalisés avec les ascites négatives ou des anticorps monoclonaux non spécifiques se traduisent par une infection constante, prouvée secondairement par la
20 multiplication des promastigotes in vitro.

3 - CARACTERISATION DES ANTIGENES

 Les antigènes des différentes espèces de Leishmanies pouvant être reconnus par le mélange des anticorps monoclonaux inhibiteurs, ont été répertoriés dans le ta-
25 bleau ci-après :

TABLEAU

		<u>L. mexicana</u> <u>L. brasiliensis</u>			
Espèces		<u>L. infantum</u>	<u>L. tropica</u>	<u>amazonensis</u>	<u>guyanensis</u>
5	poids	113	113	113	113
					80
	moléculaire	70	70	70	70
		68			
		48		<u>60</u>	<u>60</u>
10	(en	44		44	44
	kilo-	40	40	<u>40</u>	<u>40</u>
	daltons)			36	36

Les nombres soulignés indiquent une forte réaction entre l'antigène et l'anticorps. Il est important de souligner que trois antigènes de poids moléculaire 40 kD, 70 kD et 113 kD sont constamment reconnus dans la panoplie des leishmannies de l'Ancien et du Nouveau monde. Les anticorps leur correspondant permettant de prévenir l'infection par les promastigotes chez la souris, on peut penser que l'un ou l'autre de ces antigènes peut jouer un rôle dans l'acquisition d'une immunoprotection croisée. A titre comparatif, les résultats des immuno-empreintes réalisées avec les sérums des deux malades leishmaniens ont été également colligés. Ils mettent également en évidence un antigène de 70 kD, mais non ceux de 40 kD et 113 kD. La reconnaissance de plus de 5 antigènes chez L. mexicana amazonensis et L. brasiliensis guyanensis suggère des parentés antigéniques entre les différents constituants de la souche.

Il apparaît donc que l'antigène de 70 kD est :

- 1°) immunogène tant chez la souris que chez l'homme,
- 2°) présent dans toutes les souches de leishmanies étudiées.

De même ont été isolés des anticorps monoclonaux qui se sont avérés reconnaître une molécule de poids

moléculaire d'environ 140.000 dans des lysats de plusieurs leishmanies.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être également utilisés en tant que véhicules pour transporter une molécule toxique (par exemple la gelonine) ou un médicament anti-parasitaire et le concentrer sur les sites mêmes de son action, plus particulièrement les parasites eux-mêmes sous leur forme promastigote ou amastigote. Ainsi, les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent-ils être couplés chimiquement de façon covalente avec des substances toxiques ou des substances médicamenteuses anti-leishmania. Ce couplage covalent mettra naturellement en jeu des groupes fonctionnels tant de l'anticorps que des médicaments utilisés qui n'interviennent pas dans la réaction antigène-anticorps, d'une part, au niveau de l'action des substances, d'autre part. Des médicaments appropriés ont été envisagés dans la demande internationale WO83/01785. Dans une forme avantageuse de conjugués susceptibles d'être utilisés, le médicament est encapsulé dans des liposomes, ceux-ci étant eux-mêmes liés de façon covalente à l'anticorps, par exemple par l'intermédiaire du N-succinimidyl-3-(2-pyridyl-dithio)-propionate (SPDP) : voir notamment J. Biol. Chem. 255, 2015-2018 (1980) ; Nature, vol. 293, n° 5829, p. 228, 1981 et J. of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 16, p. 243-258 (1981).

Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent également être utilisés pour purifier des compositions polypeptidiques susceptibles de contenir des protéines immunogènes, telles que les antigènes de poids moléculaires 40.000, 70.000, 113.000 ou 140.000 daltons, selon la nature de l'anticorps utilisé. Ce procédé est avantageusement appliqué à des extraits obtenus à partir des parasites (par exemple lysats de parasites). Il peut aussi être appliqué à l'extraction de ces polypeptides des surnageants de milieux de culture de ces parasites, dès lors

que ces surnageants sont susceptibles de contenir de tels polypeptides en tant que produits du métabolisme desdits parasites. Pour la mise en oeuvre de ce procédé, les anticorps monoclonaux sont avantageusement immobilisés sur un support solide, de préférence adapté à des opérations de chromatographie d'affinité. Par exemple, ces anticorps monoclonaux sont fixés sur un réseau d'agarose à réticulation tri-dimensionnelle, commercialisé sous la marque SEPHAROSE par la société suédoise PHARMACIA A.G., par exemple par la méthode au bromure de cyanogène.

L'invention concerne donc plus particulièrement un procédé de séparation de ces antigènes caractérisés par les opérations consistant à faire passer le milieu susceptible de les contenir (notamment extrait de parasite ou milieu de croissance de ces parasites) au contact d'une colonne d'affinité portant les susdits anticorps monoclonaux, pour fixer sélectivement lesdits polypeptides, puis à récupérer ceux-ci par dissociation du complexe antigène-anticorps au moyen d'un tampon approprié, notamment d'une solution de force ionique adéquate, notamment d'un sel, de préférence l'acétate d'ammonium (lequel ne laisse pas de résidu lorsque l'on réalise ensuite la lyophilisation de la préparation). On peut également avoir recours à une solution acidifiée à pH 3-4 ou à un tampon glycine au même pH.

L'invention concerne également les polypeptides communs à plusieurs leishmanies, et plus particulièrement ceux qui sont reconnus par les anticorps monoclonaux sécrétés par les souches d'hybridomes qui ont été déposées à la Collection Nationale des Cultures de Micro-organismes (C.N.C.M.) de l'INSTITUT PASTEUR de Paris, sous les n° I-344 et I-345 le 1er octobre 1984.

L'invention concerne plus particulièrement encore parmi ces polypeptides ceux d'entre eux, notamment celui qui présente un poids moléculaire de l'ordre de 70.000, qui est également reconnu par des sérums provenant de malades humains affectés par des leishmanioses.

Ces polypeptides ou antigènes sont eux-mêmes susceptibles d'être utilisés comme réactifs, ou même comme agents de diagnostic in vitro, pour la détection d'anticorps anti-Leishmania. Il va de soi que l'invention concerne également des fractions polypeptidiques pouvant avoir des poids moléculaires plus faibles, dès lors qu'ils porteraient des sites antigéniques susceptibles d'être reconnus par les mêmes anticorps monoclonaux. Il apparaîtra clairement au spécialiste qu'à partir de l'instant où l'on dispose des anticorps monoclonaux selon l'invention, on peut envisager l'isolement, à partir des antigènes sus-indiqués, des séquences peptidiques plus petites contenant les mêmes sites antigéniques, par exemple en ayant recours à des techniques en soi connues de découpage du polypeptide initial par des enzymes susceptibles de découper les polypeptides plus grands en des sites spécifiques. A titre d'exemple de telles protéines, on peut mentionner l'enzyme de Staphylococcus aureus V8, l'alpha-chymotrypsine, la "protéase de glande sous-maxillaires de souris" (mouse submaxillary gland protease) commercialisée par la société BOEHRINGER, la collagénase de Vibrio alginolyticus chemovar iophagus, qui reconnaît spécifiquement lesdits peptides Gly-Pro et Gly-Ala, etc..

Les polypeptides du genre en question peuvent également être utilisés pour séparer des anticorps présentant les caractéristiques sus-indiquées à partir d'un mélange polyclonal d'anticorps. Dans ce cas, les polypeptides du genre en question seront à leur tour immobilisés sur un support de chromatographie d'affinité, par exemple du genre indiqué plus haut. Le procédé de séparation comprendra par conséquent l'étape consistant à faire passer une solution contenant les anticorps polyclonaux au contact des polypeptides immobilisés, et l'étape de récupération des anticorps retenus au moyen d'une solution ou d'un tampon analogue à celle ou celui qui a été envisagé plus haut.

Enfin l'invention concerne des compositions immunogènes caractérisées par l'association de l'un des antigènes immunogènes sus-indiqués avec un excipient physiologiquement acceptable permettant son administration à un hôte vivant, en vue de lui conférer une immunité à l'égard desdits polypeptides. Ces polypeptides constituent des principes actifs dont l'immunogénicité peut être mise en oeuvre à chaque fois qu'est recherchée une protection in vivo contre des parasites.

L'invention concerne également un procédé utilisant les antigènes reconnus par les susdits anticorps monoclonaux pour la détection de la présence d'anticorps anti-Leishmania, notamment dans des échantillons sanguins provenant de l'homme ou de l'animal, en vue d'effectuer la détection de l'affection.

Dans une variante de ce procédé, la détection de la présence d'anticorps anti-Leishmania met en jeu des réactions d'hypersensibilité (réactions intradermiques) nécessaires au diagnostic de l'affection chez l'homme ou l'animal.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes ; en alternative, l'invention concerne un procédé utilisant l'infection des cellules sarcomateuses TG180 par les parasites (forme amastigote) pour déterminer l'efficacité de nouvelles formes d'anticorps (mono- ou polyclonaux) pour juguler l'infection parasitaire. Le même test peut être utilisé pour déterminer l'efficacité de nouvelles molécules médicamenteuses anti-Leishmaniose.

La souche de cellule sarcomateuse TG180 a été déposée à la CNCM (Collection Nationale des Cultures de Micro-organismes de l'INSTITUT PASTEUR) sous le numéro I-343, le 26 septembre 1984.

La souche de parasite L. infantum (LEM 497) qui a été utilisée dans l'immunisation initiale des souris en vue de la production des anticorps monoclonaux plus particulièrement décrits dans les exemples, a été déposée à
5 la CNCM le 26 septembre 1984 sous le numéro I-342.

Il est entendu que lorsque l'on a fait usage du mot "leishmanies", c'est naturellement des parasites du genre *Leishmania* qu'il s'agissait.

REVENDICATIONS

1. Anticorps monoclonaux anti-Leishmania, caractérisés par leur capacité à inhiber l'infection de cellules sarcomateuses par les formes promastigotes de une ou plusieurs espèces de Leishmania, lorsque ces cellules sarcomateuses sont mises en contact avec lesdites formes promastigotes pré-incubées avec ces anticorps monoclonaux dans des conditions qui, en l'absence desdits anticorps monoclonaux, conduiraient à une parasitémie élevée dans lesdites cellules.

2. Anticorps monoclonaux selon la revendication 1, caractérisés par leur capacité à simultanément inhiber les infections de cellules sarcomateuses par des Leishmanies appartenant aux espèces L. mexicana, L. tropica et L. donovani, L. brasiliensis et L. infantum.

3. Anticorps monoclonaux selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés par leur capacité à inhiber l'infection de cellules sarcomateuses de souris appartenant à la lignée TG180.

4. Anticorps monoclonaux selon la revendication 3, caractérisés par la capacité qu'ils ont d'inhiber l'infection parasitaire de cellules de la lignée TG180, lorsque 2×10^3 cellules de cette lignée sont injectés dans le péritoine de souris Balb-C, en mélange avec 60 microlitres d'ascite contenant les susdits anticorps monoclonaux et 10^5 promastigotes qui avaient été incubés au préalable en présence desdits anticorps monoclonaux à 37°C et pendant 30 minutes.

5. Anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'ils sont secrétés par des hybridomes qui ont été déposés à la C.N.C.M. respectivement sous les n° I-344 et I-345 le 1er octobre 1984.

6. Anticorps monoclonaux selon la revendication 5, caractérisés en ce qu'ils reconnaissent des protéines

ayant des poids moléculaires de l'ordre de :

40.000

70.000

113.000

5 contenues dans des lysats de Leishmanies.

7. Anticorps monoclonaux selon la revendication 5, caractérisés en ce qu'ils reconnaissent des protéines ayant des poids moléculaires de l'ordre de 140.000 et contenues dans des lysats de Leishmanies.

10 8. Anticorps monoclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent des protéines qui sont également reconnues in vitro par des sérums provenant de malades atteints de leishmaniose.

9. Hybridomes sécréteurs, caractérisés par le fait que les anticorps monoclonaux qu'ils secrètent sont conformes à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10. Procédé d'obtention et d'isolement d'hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux anti-leishmania possédant les propriétés sus-indiquées, caractérisé en ce que l'on met en contact les formes promastigotes infectieuses avec, d'une part, des anticorps monoclonaux reconnaissant des antigènes d'une ou plusieurs espèces de leishmanies et secrétés parmi des hybridomes préalablement formés de façon en soi connue entre des cellules de myélome et des cellules spléniques d'un animal, notamment la souris, préalablement immunisé contre une ou plusieurs souches de leishmanies et, d'autre part, avec des cellules sarcomateuses dans des conditions qui, en l'absence desdits anticorps, conduiraient à une infection parasitaire desdites cellules sarcomateuses, et en ce que l'on sélectionne ceux de ces anticorps monoclonaux qui, dans l'opération précédente, protègent complètement in vivo les cellules sarcomateuses vis-à-vis de l'infection par lesdites leishmanies, après leur injection dans le péritoine d'une souris sensible auxdites cellules sarcomateuses, plus particulièrement d'une souris Balb-C.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les cellules sarcomateuses utilisées appartiennent à la lignée des cellules sarcomateuses de souris dénommées TG180.

5 12. Polypeptides des parasites des leishmanioses ayant des poids moléculaires de l'ordre de 40.000, 70.000 et 113.000 daltons, ces polypeptides ayant la caractéristique d'être reconnus par les anticorps monoclonaux sécrétés par l'hybridome déposé à la C.N.C.M. sous
10 les numéros I-344 et I-345 le 1er octobre 1984.

13. Polypeptides de parasites de leishmanioses humaines et animales, notamment canines, ayant des poids moléculaires de l'ordre de 140.000 et ayant la caractéristique d'être reconnus par les anticorps monoclonaux
15 conformes à la revendication 1.

14. Polypeptides selon la revendication 12 ou la revendication 13, caractérisés en ce qu'ils sont reconnus par des sérums humains contenant des anticorps à l'égard des Leishmanies.

20 15. Composition pour la production de vaccins, caractérisée par l'association d'un ou plusieurs polypeptides selon l'une quelconque des revendications 12 à 14 avec un véhicule pharmaceutique approprié à la vaccination.
25

16. Procédé pour la détection ou le diagnostic in vitro de l'infection par les Leishmanies chez l'homme ou l'animal, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact de cellules, provenant notamment d'une biopsie
30 tissulaire (moëlle osseuse, rate ou foie), avec des anticorps monoclonaux tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, et la détection, notamment par immunofluorescence, d'une réaction entre lesdits anticorps monoclonaux et lesdites cellules en cas d'infection.

35 17. Procédé utilisant les antigènes selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, permettant de détecter in vitro la présence d'anticorps anti-Leishmania

dans le sérum d'un patient humain ou animal et d'effectuer ainsi le diagnostic in vivo de l'infection chez l'homme ou l'animal.